

## 【総説】

# 原発性胆汁性肝硬変 (PBC) における胆管消失の分子機構： 胆管消失は再生不良によるか？

金沢大学医学系研究科形態機能病理学

佐々木 素子

## はじめに

原発性胆汁性肝硬変 (primary biliary cirrhosis; PBC) は代表的な臓器特異的な自己免疫性疾患であり、その標的組織は肝内の小型胆管 (小葉間胆管) である。病理組織学的にPBCでは小型胆管の非化膿性破壊性胆管炎 (CNSDC) が特徴である<sup>1),2)</sup> (図1)。最終的には、小型胆管が広範に消失して胆汁性肝線維症から肝硬変へと進展する<sup>1)</sup>。PBCのもうひとつの特徴は患者血清中に高率 (95%以上) に検出される抗ミトコンドリア抗体 (AMA) である<sup>3)</sup>。このAMAの主要抗原はミトコンドリア内膜に存在するピルビン酸脱水素酵素E2コンポーネント (E2 component of pyruvate dehydrogenase complex; PDC-E2) である。また、T細胞性の反応もAMAと同様のエピトープを標的とすることが明らかになってきている<sup>4)</sup>。しかし、PBCの原因、胆管破壊・胆管消失の発症機序やAMAとの関連は未だ解明されていない<sup>2),3)</sup>。全ての細胞に存在するミトコンドリアが標的抗原なのになぜ胆管のみが破壊されるのか？AMAは胆管破壊にどのように関与しているか？なぜ肝内大型胆管ではなく小型胆管のみが障害されるのか？など、数多くの謎が残されている<sup>3)</sup>。

## PBCの動物モデル

疾患を研究する上で適当な動物モデルは必要不可欠であるが、PBCの良い動物モデルはないのが現状である。通常は自己抗原で免疫することで動物モデルを作成できるが、PBCの場合、自己抗原PDC-E2を用いてマウスやウサギを免疫しても、血清

AMAはできるが胆管炎は発症しない<sup>2)-4)</sup>。Jonesらは自己免疫性素因のあるSJL/JマウスをPDC-E2で免疫すると肝内胆管に著明な胆管炎がおけると報告している<sup>5)</sup>。しかし、私どもの検討では、SJL/Jマウスの胆管炎は抗原非特異的に生じていることがわかった<sup>6),7)</sup>。すなわち、陰性対照としてカゼインで免疫した場合にもPDC-E2と同様の胆管炎がおこり、両者には明らかな差は見られなかった (図2)<sup>6),7)</sup>。また、胆管炎から胆管消失や肝硬変への進展はなかった。これらの所見から、PBCの胆管炎はAMAの存在のみでは生じず、その発症機構は多因子が関連する複雑なものであることが示唆された。

そこで、PBCの肝内胆管の破壊と消失には、免疫性機序による胆管上皮へのアタックに加えて何らかの胆管上皮側の要因、例えば胆管上皮の再生・修復機構の異常が関連するのではないかと考えるようになった。

## PBCの胆管消失は再生不良によるか？

本来、胆管細胞は増殖能、再生能に優れており、障害胆管は再生胆管細胞により速やかに修復されるはずである。再生修復機構が十分に機能していれば、一時的な胆管障害があっても、胆管の完全な破壊や胆管消失には至らないと思われる。実際、薬剤性胆管障害や胆道感染症などの胆管傷害後では胆管細胞は容易に再生・修復する。しかし、PBC、原発性硬化性胆管炎 (PSC) や肝移植後の拒絶反応では胆管傷害が進行し胆管細胞の再生はみられず、胆管消失が不可逆性に進行する。これら不可

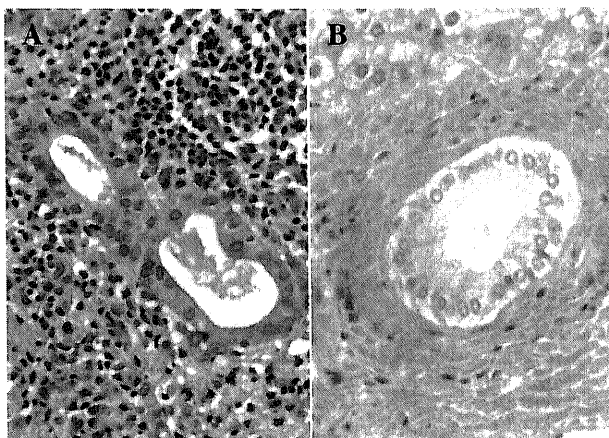


図1. A) PBCの慢性非化膿性破壊性胆管炎 (CNSDC)  
B) 正常肝内小型胆管 H & E染色像

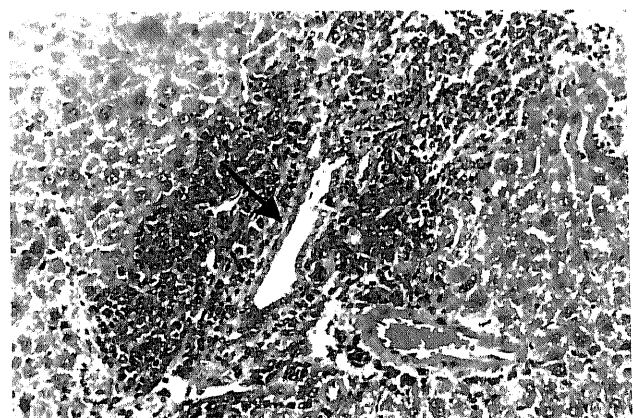


図2. カゼイン (対照) で免疫したSJLマウス (免疫後30週) の組織像。門脈域の慢性炎症と軽度の胆管炎 (矢印) をみる。H & E染色像

逆的胆管消失をきたす疾患は肝内胆管消失症候群と総称される。そこで私どもは、“PBCでは胆管の再生障害が胆管消失につながる”のではないかと仮説をたてて研究をすすめている<sup>8)</sup>。肝内胆管粘膜の再生・修復は消化管潰瘍の治癒と共通する点が多い。そこでまず、消化管粘膜上皮の再生に関与する因子の面から胆管上皮の再生・修復機構の検討を始めた。最近、細胞老化 (cellular senescence) の観点から、胆管細胞の老化とPBCにおける胆管破壊、消失の関連を検討している。

#### I. PBCの胆管病変と消化管粘膜再生関連因子

##### 粘膜再生因子Trefoil factor family (TFF) 1-3

TFF1, 2, 3は消化管潰瘍辺縁の上皮細胞での発現亢進がみられる重要な粘膜再生因子である。TFF1-3は上皮細胞の損傷部への遊走作用や抗アポトーシス作用を示し、TFFノックアウトマウスでは潰瘍治癒遅延が報告されている。TFF受容体は不明であるがDeleted in malignant brain tumor-1 (DMBT1)はTFF2受容体の候補分子である。肝内胆管におけるこれらの分子の生理学的、病理学的発現動態について殆ど報告されていない<sup>8)~12)</sup>。私どもの免疫組織化学的検討では、1) 正常肝の肝内小型胆管

でのTFF1-3, DMBT1発現はほとんどないこと、2) PSCと閉塞性黄疸肝では肝内大型胆管でのTFF1, 3とDMBT1発現が亢進すること、3) PBCとウイルス性慢性肝炎では胆管障害部を中心にTFF2とDMBT1発現が亢進すること、が明らかとなった<sup>8)</sup>。肝内胆管粘膜においても消化管粘膜と同様にTFFが粘膜上皮の再生に関与することがわかった。また、肝内胆管系では胆管レベルに応じた特徴的なTFF1-3, DMBT1発現がみられ、大型胆管では主にTFF1, 3/DMBT1が、小型胆管では主にTFF2/DMBT1が粘膜防御に働くことが示唆された。しかし、PBCの胆管障害部ではTFF2とDMBT1の共発現はあまり見られず、TFF2/TFF2受容体による粘膜再生機構が十分に働いていない可能性が示唆された<sup>8)</sup>。

##### 肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor, HGF)

HGFとその受容体cMETも消化管粘膜上皮再生に重要な因子である。HGFの活性化にはHGF activator (HGFA) とHGFA inhibitor type 1 (HAI-1) が関与する。この内、HAI-1は炎症性腸疾患や潰瘍周囲の障害上皮において発現が亢進し、障害局所で活性型HGFを濃縮することによって粘膜再生に役立つとされ

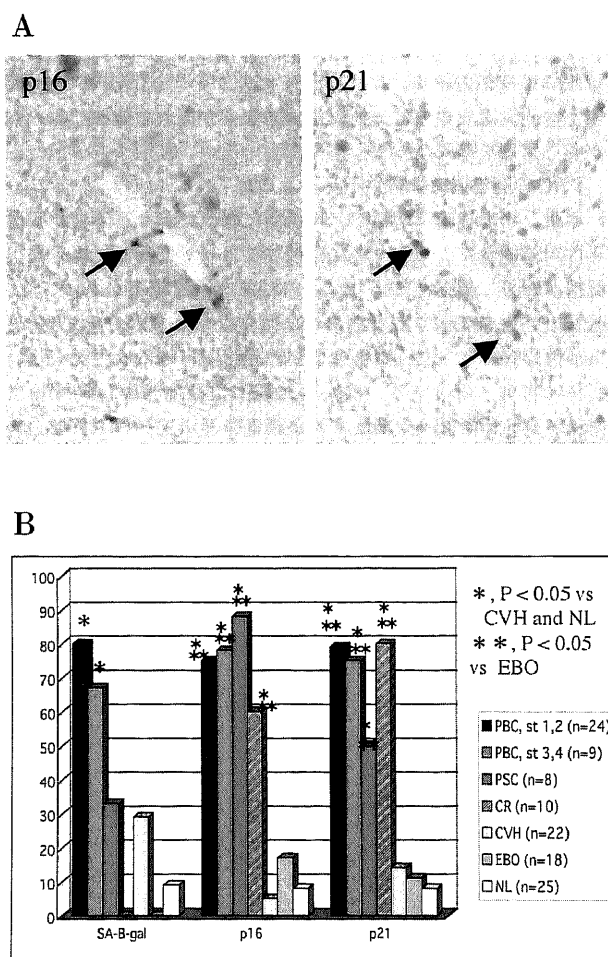


図3. A) PBCの胆管障害部上皮細胞におけるP16, P21の発現亢進 (矢印)

B) 肝内小型胆管での細胞老化マーカーの発現: 各種肝疾患での検討 (CR, 移植肝慢性拒絶; CVH, ウイルス性慢性肝炎; EBO, 閉塞性黄疸肝; NL, 正常肝)

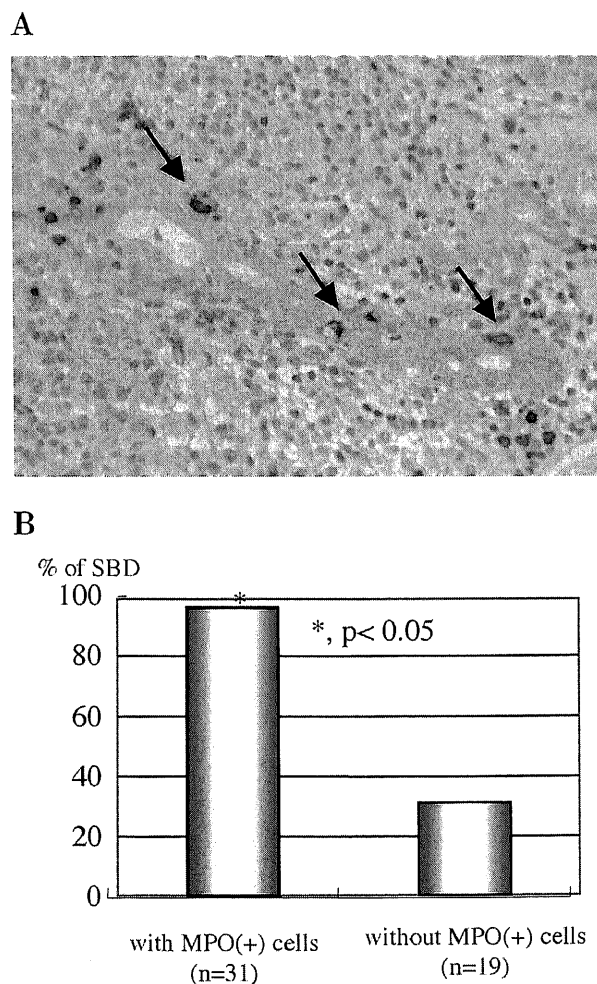


図4. A) PBCでの胆管上皮層内へのMPO陽性炎症細胞の浸潤 (矢印)

B) 細胞老化マーカーP16発現とMPO陽性細胞の上皮層内浸潤の有無. PBC6症例の肝内小型胆管50個を無作為に選んで検討した。

る。PBCと対照肝でのHGFAとHAI-1の発現を検討した所、PBCの胆管障害部に一致してHAI-1発現の亢進を認めた(投稿準備中)。HGFAの発現は正常肝、疾患肝ともに胆管上皮にびまん性に見られた。これらの所見も胆管粘膜上皮の再生修復には消化管上皮と同様の機構が働いていることを示している。

## II. PBCの胆管破壊・胆管消失の発生機序と細胞老化

### 細胞老化 (cellular senescence) とは

細胞老化 (cellular senescence) は“種々の障害因子によって生じる細胞増殖の停止状態”と定義される。もともと細胞老化は1961年にHayflick<sup>13)</sup>により発見された現象で、正常な体細胞を哺乳動物の個体から取り出して培養すると、ある一定の回数分裂増殖を繰り返した後に増殖を停止し不可逆的な増殖停止状態に入る現象である<sup>13)</sup>。その後の研究でテロメア短縮が細胞老化の主因であることが明らかになった(内因性細胞老化)。さらに、種々のストレスによっても、テロメア長非依存性に細胞老化が誘導されることがわかってきた(外因性細胞老化)<sup>14)</sup>。細胞老化をおこした細胞には特徴的な形態学的変化(後述)、老化マーカー: senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) の発現<sup>15)</sup>、細胞周期調節因子であるp16 (INK4a), p21 (WAF1/Cip) の著明な発現レベルの上昇が見られる。p16 (INK4a), p21 (WAF1/Cip) の発現亢進によってCDKキナーゼの活性がブロックされ、細胞周期がG1期で停止する。最近、細胞老化はアポトーシスと並ぶ重要な癌抑制機構としての役割や各種疾患の病態形成への関与が注目されている。

### 移植後慢性拒絶肝における胆管消失と細胞老化

PBCと同様に進行性の胆管消失と慢性胆汁鬱滞をきたす疾患群は胆管消失症候群と総称され、その胆管消失の機序として何らかの共通する経路の存在が考えられている。肝移植後慢性拒絶も胆管消失症候群に含まれる。最近、Lunzらは肝移植後慢性拒絶にみられる胆管の消失に胆管細胞の細胞老化が関与することを報告している<sup>16)</sup>。すなわち、肝移植後慢性拒絶早期の胆管細胞は形態学的な老化形質を示し、老化関連形質p21 (WAF1/CIP) の発現亢進がみられる<sup>16)</sup>。細胞老化に陥った胆管細胞には免疫性細胞障害に対する反応性の細胞増殖が見られず、胆管の再生不全が生じて胆管消失につながると考えられる<sup>16)</sup>。

### PBCの胆管障害部における細胞老化 (図3)

形態学的細胞老化: 細胞老化を示す形態学的特徴として細胞質の好酸化、細胞や核の腫大、細胞の配列不整、核間距離の拡大、多核化などがあげられる<sup>16),17)</sup>。PBC50例の外科的生検材料の病理組織標本(HE染色)をあらためて観察し直し、胆管における形態学的老化形質の有無を検討した。その結果、早期PBCのCNSDCを示す小型胆管を中心に形態学的老化形質を認めた。すなわち、胆管周囲の肉芽腫性変化を含む慢性炎症と胆管上皮層内のリンパ球、好中球など炎症細胞浸潤を伴うPBCの障害小型胆管において細胞質の好酸化、細胞の配列不整、核間距離の拡大が見られた(図1A)。また、同部では胆管細胞の一部に、胆管細胞の多核化と考えられる像も認めた。進行期PBCにおいてもCNSDCを伴う症例では同部に形態学的老化形質が観察された。これに対して、慢性ウイルス性肝炎などの対照疾患肝や対照正常肝の肝内小型胆管には形態学的老化形質は全く見られなかった(図1B)(投稿中)。

SA- $\beta$ -galの発現: PBCと対照肝の凍結肝組織切片を用い、Dimriらの方法<sup>15)</sup>で細胞老化マーカー: SA- $\beta$ -galの発現を検出した。PBCの肝内小型胆管ではCNSDC部を中心にSA- $\beta$ -gal発現を認めた。一方、慢性肝炎や正常肝の小型胆管ではSA- $\beta$ -gal発現は殆どみられず、PBCとの間に有意差を認めた。細胞老化マーカー: SA- $\beta$ -gal発現が亢進している点からもPBCの小型胆管は細胞老化状態であることが示された(投稿中)。

老化関連p16 (INK4a), p21 (WAF1/Cip) の発現: 老化細胞ではCDKインヒビター: p16 (INK4a) とp21 (WAF1/Cip) の発現亢進がみられる。PBCと対照肝の胆管におけるこれらの発現を免疫組織化学的に検討した。PBCの肝内小型胆管ではCNSDCを示す胆管病変部を中心に、高率にp16 (INK4a), p21 (WAF1/Cip) の発現を認めた(図3A)。発現は主に、胆管細胞の核に見られた。p16 (INK4a) の発現は一部、細胞質にも認められた。一方、慢性肝炎や閉塞性黄疸肝、正常肝ではp16, p21発現ともに低率であり、PBCとの間に有意差を認めた(図3B)(投稿中)。p16 (INK4a) とp21 (WAF1/Cip) の発現亢進の面からも、PBCの障害小型胆管では高率に細胞老化が生じていると考えられる。

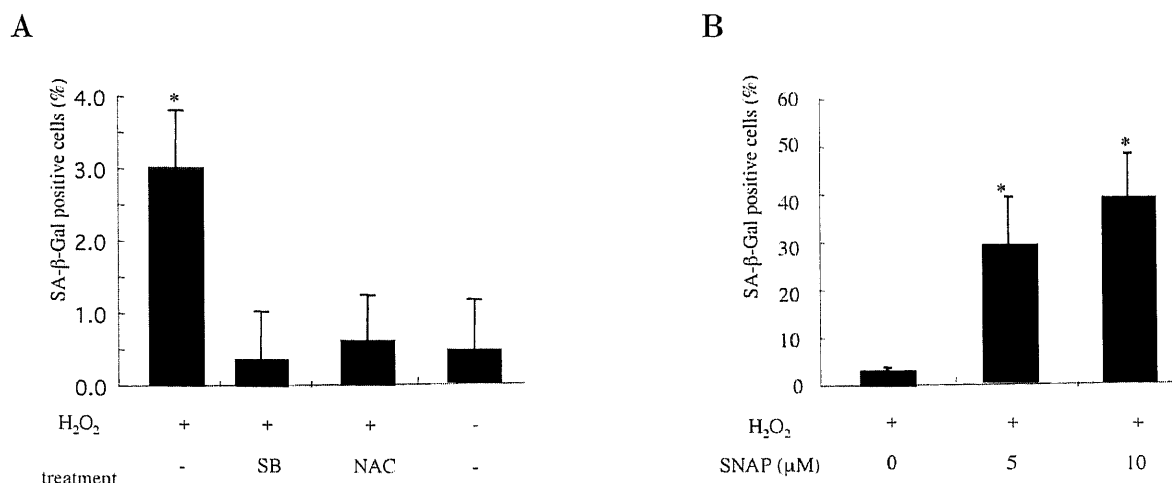


図5. A) 過酸化水素添加による培養マウス胆管細胞の細胞老化の誘導と抗酸化剤N-acetylcysteine (NAC), p38MAPK抑制剤SB203580 (SB) による老化抑制  
B) 培養マウス胆管細胞細胞老化のSNAP投与による増強

これらの結果から、PBCの障害小型胆管は明らかに“細胞老化”の状態にあることがわかった。老化胆管には反応性の細胞増殖がおこらず、老化胆管細胞は再生胆管細胞によって置換されずに停滞すると予想される。一般に老化細胞の停滞は組織の再生修復の遅延、局所の炎症持続の原因となることが報告されている<sup>14),16)</sup>。これらの点を考慮すると、PBCでは障害胆管が老化状態にあることが胆管の再生不良の原因となり、胆管の破壊と胆管消失につながると考えられる。

#### PBCにおける細胞老化の発生機序—酸化ストレスの関与？

PBCでの胆管細胞老化誘導因子については全くわかっておらず、今後の検討課題である。一般に、細胞老化を誘導する因子としてはX線、紫外線や酸化ストレスが知られている。このうち、PBCにおける細胞老化誘導因子として最も有力な候補は酸化ストレスと思われる。以前よりPBC患者血清中の酸化ストレスマーカー増加やPBCの障害胆管における酸化ストレス亢進に関する報告は散見されている<sup>18)</sup>。PBCの治療に用いられるウルソデオキシコール酸(UDCA)は細胞内ミトコンドリアの酸化ストレス軽減作用を持つ事<sup>19)</sup>も、PBCにおける酸化ストレスの関与を示すと思われる。

#### 胆管細胞老化と胆管上皮層内ミエロペロキシダーゼ(MPO)陽性炎症細胞の相関

MPO陽性の好中球や単球の浸潤は酸化ストレスとニトロ化ストレスを局所に同時に与える事で細胞障害を起こす事が知られる。最近、WuらはPBCの胆管上皮層内にMPO陽性炎症細胞が高率に浸潤しており、蛋白のニトロ化を介して胆管障害を与える可能性を報告している<sup>20)</sup>。私どもの検討でもPBCのCNSDC部では多数のMPO陽性細胞が上皮層内に浸潤していた(図4A)。さらに、MPO陽性細胞の上皮層内浸潤と胆管細胞の老化マーカー発現には有意に正の相関が認められた(図4B)。この結果から、上皮層内に浸潤したMPO陽性細胞が胆管細胞の酸化ストレスとニトロ化ストレスを介して細胞老化に寄与している可能性が示唆された(投稿中)。

#### 酸化ストレスによる細胞老化の誘導

培養マウス胆管細胞(BALB/Cマウス肝内末梢胆管由来)をコラーゲンゲル上で培養し、過酸化水素添加(112 $\mu$ M, 2時間)

による細胞老化誘導を試みた。過酸化水素濃度については予備的検討により、至適濃度を決定した。Dimriらの方法<sup>15)</sup>に従いSA- $\beta$ -gal活性を検出することで老化細胞を同定した。この結果、過酸化水素添加によって有意に培養マウス胆管細胞中の老化細胞の割合が増加した(図5A)。この細胞老化は抗酸化剤であるN-acetylcysteine(NAC)による前処理で有意に抑制された。過酸化水素添加による酸化ストレスで培養マウス胆管細胞の細胞老化が生じることが明らかになった。

また、過酸化水素添加とNOドナーとしてニトロ化ストレスの実験に用いられるS-nitroso-N-acetylpenicillamine(SNAP)投与を組み合わせた所、SNAP投与により細胞老化誘導の亢進が認められた(図5B)。この結果から、酸化ストレスとニトロ化ストレスの組み合わせが実際に胆管細胞の細胞老化を引き起こすことが明らかになった。

#### まとめ

図6に酸化ストレス、胆管細胞老化とPBCの胆管消失の関係についてシェーマを示した。PBCの肝内小型胆管の胆管病変では高率に細胞老化がみられ、胆管細胞の老化がPBCの病態形成に関与することが示された。胆管細胞の老化は胆管炎の持続と胆管の再生不良の原因となり胆管消失につながる可能性が考えられた。細胞老化の発生機序として酸化ストレスや炎症性サイトカインの関与が疑われる。さらに、AMA、T細胞性細胞障害などの自己免疫性機序と胆管細胞老化の関連性についても今後さらなる検討が必要であろう。また、胆管細胞の老化という観点からPBCモデル動物が作成できないかと考えている。

#### 文 献

- 1) Portmann, B., and Nakanuma, Y. Diseases of the bile ducts. In Pathology of the Liver. R. MacSween, A. Burt, P. BC, K. Ishak, P. Scheuer, and P. Anthony, editors. p435-506 Churchill Livingstone. London 2001.
- 2) Sasaki M, Ansari AA, Nakanuma Y, Coppel RL, Keffe EB, Gershwin ME. The immunopathology of primary biliary cirrhosis: thoughts for the millennium. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 48:1-10, 2000.
- 3) Neuberger, J., and Thomson, R. PBC and AMA-What is the connection? Hepatology 29: 271-276, 1999.
- 4) Sasaki M, Van De Water J, Kenny TP, Gallo ML, Leung PS, Nakanuma Y, Ansari AA, et al. Immunoglobulin gene usage and immunohistochemical characteristics of human monoclonal antibodies to the mitochondrial autoantigens of primary biliary cirrhosis induced in the XenoMouse. Hepatology 34: 631-637, 2001
- 5) Jones D, Palmer J, Yeaman S, Kirby J, Bassendine M. Breakdown of tolerance to pyruvate dehydrogenase complex in experimental autoimmune cholangitis: A mouse model of primary biliary cirrhosis. Hepatology 30: 65-70, 1999.
- 6) Sasaki M, Long SA, Van De Water J, He XS, Shultz L, Coppel RL, Ansari A, et al. The SJL/J mouse is not a model for PBC. Hepatology 35: 1284-1286, 2002.
- 7) Sasaki M, Allina J, Odin JA, Thung SN, Coppel R, Nakanuma Y, Gershwin ME. Autoimmune cholangitis in the SJL/J mouse is antigen non-specific. Dev Immunol 9: 103-111, 2002.

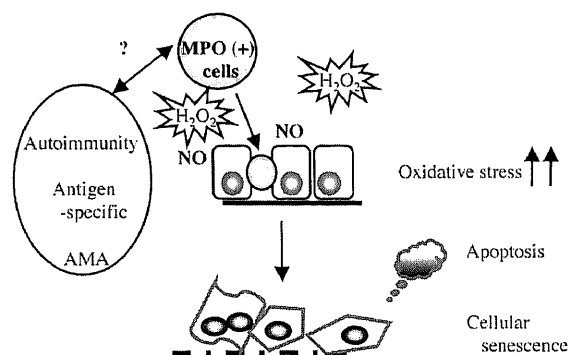


図6. PBCの胆管破壊、消失の発生機序：酸化ストレスと胆管細胞老化の関与

- 8) Sasaki M, Tsuneyama K, Saito T, Kataoka H, Mollenhauer J, Poustka A, Nakanuma Y. Site-characteristic expression and induction of trefoil factor family 1, 2 and 3 and malignant brain tumor-1 in normal and diseased intrahepatic bile ducts relate to biliary pathophysiology. *Liver Int* 24: 29-37, 2004.
- 9) Sasaki M, Ikeda H, Ohira S, Ishikawa A, Nakanuma Y. Expression of trefoil factor family 1, 2, and 3 peptide is augmented in hepatolithiasis. *Peptides* 25: 763-770, 2004.
- 10) Sasaki M, Huang SF, Chen MF, Jan YY, Yeh TS, Ishikawa A, Mollenhauer J, et al. Expression of deleted in malignant brain tumor-1 (DMBT1) molecule in biliary epithelium is augmented in hepatolithiasis: possible participation in lithogenesis. *Dig Dis Sci* 48: 1234-1240, 2003.
- 11) Sasaki M, Huang SF, Chen MF, Jan YY, Yeh TS, Ishikawa A, Mollenhauer J, et al. Decrease of deleted in malignant brain tumour-1 (DMBT-1) expression is a crucial late event in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Histopathology* 43: 340-346, 2003.
- 12) Sasaki M, Tsuneyama K, Nakanuma Y. Aberrant expression of trefoil factor family 1 in biliary epithelium in hepatolithiasis and cholangiocarcinoma. *Lab Invest* 83: 1403-1413, 2003.
- 13) Hayflick, L and Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621, 1961.
- 14) Sharpless NE, DePinho RA. Telomeres, stem cells, senescence, and cancer. *J Clin Invest* 113: 160-168, 2004.
- 15) Dimri, GP, Lee, X, Basile, G, Acosta M, Scott G, Roskelley, C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9363-9367, 1995.
- 16) Lunz, JG, 3rd, Contrucci, S., Ruppert, K., Murase N, Fung JJ, Starzl TE, Demetris AJ. Replicative senescence of biliary epithelial cells precedes bile duct loss in chronic liver allograft rejection: increased expression of p21 (WAF1/Cip1) as a disease marker and the influence of immunosuppressive drugs. *Am J Pathol* 158: 1379-1390, 2001.
- 17) Demetris, A.J., Markus, B.H., Saidman, S., et al. Isolation and primary cultures of human intrahepatic bile ductular epithelium. *In Vitro Cell Dev Biol.* 24: 464-470, 1988.
- 18) Tsuneyama, K., Harada, K., Kono, N, Sasaki M, Saito T, Gershwin ME, Ikemoto M, Arai H, Nakanuma Y. Damaged interlobular bile ducts in primary biliary cirrhosis show reduced expression of glutathione-S-transferase-pi and aberrant expression of 4-hydroxynonenal. *J Hepatol.* 37: 176-183, 2002.
- 19) Serviddio G, Pereda J, Pallardo FV, Carretero J, Borrás C, Cutrin J, Vendemiale G, Poli G, Vina J, Sastre J. Ursodeoxycholic acid protects against secondary biliary cirrhosis in rats by preventing mitochondrial oxidative stress. *Hepatology* 39: 711-720, 2004.
- 20) Wu CT, Eiserich JP, Ansari AA, Coppel RL, Balasubramanian S, Bowlus CL, Gershwin ME, Van De Water J. Myeloperoxidase-positive inflammatory cells participate in bile duct damage in primary biliary cirrhosis through nitric oxide-mediated reactions. *Hepatology* 38: 1018-1025, 2003.